مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی فرآیند کشت و تخلیص توکسوئید دیفتری با تقلیل مرحله‌ای

سمانه محمدجواد[۱]، مجتبی نوفلی*[۲]، علی نظری شیروان[۳]، پژواک خاکی[۴]

تاریخ دریافت ۱۴۰۲/۰۶/۱۱ تاریخ پذیرش ۱۴۰۲/۰۹/۲۸

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: دیفتری یک بیماری حاد دستگاه تنفسی قابل‌کنترل با واکسن است که عامل آن باکتری گرم مثبت *کورینه باکتریوم دیفتریه* است. ازآنجایی‌که تهیه، تخلیص و سمیت‌زدایی واکسن این بیماری شامل مراحل متعدد و پیچیده‌ای است، بنابراین، تحقیق حاضر باهدف کوتاه کردن مراحل مختلف تخلیص توکسوئید، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: برای این منظور و با روش مقایسه‌ای و مداخله‌ای، ابتدا بهینه‌سازی سه فاکتور مقدار آهن محیط کشت، دمای کشت و میزان دور شیکر برای تولید هر چه بیشتر توکسین انجام شد. در هر مورد آزمایش سه بار تکرار شد و مقادیر Lf و Kf جهت ارزیابی تولید توکسین تست شدند. پس از غیر فعال‌سازی توکسین و تولید توکسوئید، جهت تصفیه و تخلیص توکسوئید از تقلیل مرحله‌ای با کنترل فاکتورهای کیفی استفاده گردید. در این روش از مراحل اولترافیلتراسیون، ترسیب، دیالیز و کروماتوگرافی با ستون سفادکس G-25 استفاده شد. در شرایط تقلیل مرحله‌ای نیز در حالت اول مرحله دیالیز، در حالت دوم مرحله کروماتوگرافی و در حالت سوم هر دو مرحله دیالیز و کروماتوگرافی حذف شدند. نتایج هر روش با انجام SDS-PAGE و بررسی خلوص با نرم‌افزار Minitab 18 ارزیابی گردید ($p<0.05$).

یافته‌ها: نتایج حاصل برای بهینه‌سازی محیط کشت نشان داد که مقدار آهن با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۲۰۰ rpm منجر به تولید بیشترین مقدار توکسین می‌شوند ($p<0.05$). در آزمایش‌های مربوط به تقلیل مراحل تصفیه و تخلیص توکسوئید، بهترین نتایج در سری نمونه‌های تخلیص شده با مراحل اولترافیلتراسیون، ترسیب و کروماتوگرافی ستونی به دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: ازآنجاکه در تولید صنعتی، زمان و هزینه دو فاکتور کلیدی هستند، لذا با حذف مرحله دیالیز که به‌طور تقریبی دو هفته به طول می‌انجامد، می‌توان تولید توکسوئید برای واکسن دیفتری را با هزینه کمتر و در زمان کوتاه‌تر انجام داد.

کلیدواژه‌ها: دیفتری، تخلیص، تقلیل مرحله‌ای، توکسوئید

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و چهارم، شماره نهم، ص ۵۷۵-۵۶۵، آذر ۱۴۰۲

آدرس مکاتبه: مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، تلفن: ۰۹۱۹۸۳۸۶۷۱۸

Email: noofeli1234@yahoo.com

مقدمه

دیفتری یک بیماری حاد دستگاه تنفسی قابل‌کنترل با واکسن است که عامل آن باکتری گرم مثبت *کورینه‌باکتریوم دیفتریه* است. انسان تنها منبع و مخزن *کورینه باکتریوم دیفتریه* است. در موارد ناقلینی که بدون علائم بالینی هستند، باکتری می‌تواند از طریق قطرات و ترشحات گلو، بینی و پوست دفع شود. این میکرو ارگانیسم قادر به تولید توکسینی است که باعث مهار سنتز پروتئین سلولی و نکروز بافت موضعی و تشکیل یک لایه یا غشاء کاذب می‌گردد که گاهی منجر به خفگی و مرگ می‌شود (۱). *کورینه‌باکتریوم دیفتریه* برخلاف بسیاری از باسیل‌های فاقد اسپور در برابر نور، خشک شدن و منجمد شدن مقاوم است. برای تولید توکسین این باکتری، میزان محدودی آهن در محیط کشت موردنیاز است. توکسین تولیدشده

[۱] کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی(AREEO)، تهران، ایران

[۲] دانشیار گروه آنتی ژن، گروه تحقیق و توسعه مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی(AREEO)، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] استادیار گروه تخلیص،گروه تحقیق و توسعه مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی(AREEO)، تهران، ایران

[۴] استادیار گروه میکروبیولوژی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی(AREEO)، تهران، ایران

در لایه کاذب توسط گردش خون جذب‌شده و در بافت‌های بدن توزیع می‌شود. محل ورود این باکتری غالباً سیستم تنفسی فوقانی است و همچنین می‌تواند از پوست و ندرتاً از دستگاه تناسلی، چشم و گوش میانی نیز وارد گردد (۲، ۳). دیفتری در صورت عدم درمان یکی از شدیدترین عفونت‌های باکتریایی انسان است. عفونت می‌تواند با علائم سیستمیک، ناشی از سم دیفتری، پیچیده شود. اشکال دیگر بیماری عبارت از عفونت‌های پوستی و تهاجمی، ازجمله اندوکاردیت می‌باشند. این بیماری یکی از کشنده‌ترین عفونت‌ها در کودکان خردسال بود، اما تا حد زیادی از طریق واکسیناسیون با واکسن به طرز بسیار مؤثری کنترل شده است. بااین‌وجود، هزاران مورد دیفتری هنوز سالانه گزارش می‌شود و اختلال و یا ناکارآمدی در سیستم‌های بهداشت عمومی می‌تواند منجر به شیوع گسترده این بیماری گردد (۴). استفاده گسترده از توکسوئید مؤثر و کارآمد جهت مبارزه با دیفتری سبب ریشه‌کنی نسبی این بیماری در کشورهای پیشرفته شده است. بااین‌وجود در بسیاری از کشورهای درحال‌توسعه دیفتری به حالت آندمی مشاهده می‌شود. تقریباً سالیانه ۱۲۰ کشور، مواردی از دیفتری را به WHO گزارش می دهند. این بیماری عمدتاً در کودکان بین سنین ۲ تا ۵ سال مشاهده می‌شود (۵).

واکسن دیفتری با استفاده از شکل غیرفعال توکسین دیفتری تولیدشده و مطابق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی، تزریق آن جزو الزامات برای تمامی کشورها قرار گرفته است که به همین منظور بسیاری از محققین در دنیا مطالعات و تحقیقات فراوانی برای بهبود بخشیدن به کیفیت هر چه بیشتر این فرآورده انجام می‌دهند (۶). اگرچه واکسن دیفتری ازجمله کارآمدترین و موفق‌ترین واکسن‌هایی است که در محدود کردن و کنترل بیماری دیفتری نقش بسیار با ارزشی داشته است، مع‌هذا به‌موازات کشف توکسوئید دیفتری توسط رامون و به دنبال آن مصون‌سازی گسترده جوامع و ریشه‌کنی تقریبی در کشورهای توسعه‌یافته و تأثیر مثبت آن در کنترل بیماری، اما تحقیقات در زمینه روش‌های بهینه‌سازی تولید توکسویید دیفتری همچنان از دغدغه‌های تولیدکنندگان این واکسن در دنیا است (۷).

ازآنجایی‌که تهیه، تخلیص و سمیت‌زدایی واکسن این بیماری شامل مراحل متعدد و پیچیده‌ای است و با توجه به اینکه روش متداول (Conventional) خالص‌سازی به‌منظور تولید یک توکسوئید خالص دارای معایبی ازجمله فرآیند طولانی‌مدت و جداسازی پیچیده است، دستیابی به روش‌های کارآمدتر و مناسب‌تر برای دستیابی به توکسوئید خالص از ضرورت‌های تحقیق در این زمینه است. لذا با کوتاه کردن مرحله‌ای در مراحل مختلف تخلیص توکسوئید، نه‌تنها امکان صرفه‌جوئی اقتصادی و زمانی را به همراه خواهد داشت بلکه ازنظر خلوص نیز امکان رقابت با روش‌های کلاسیک موجود را خواهد داشت. فرایندهای فعلی تخلیص بیش از چندین هفته تا چندین ماه با هزینه‌های نگهداری بالا همراه است که با استفاده از تقلیل مرحله‌ای این زمان کوتاه‌تر می‌گردد. همچنین هزینه‌های تمام‌شده هر دوز واکسن ازنظر تجاری با روش پیشنهادی مقرون‌به‌صرفه‌تر خواهد بود. مزید بر موارد فوق کاهش مرحله‌ای فرآیند تخلیص، به کاهش فضاهای تولید و متعاقباً هزینه‌های نگهداری منجر خواهد شد. برای این منظور، ابتدا بهینه‌سازی شرایط کشت از طریق ارزیابی فاکتورهایی همچون دما، مقدار آهن و rpm صورت گرفت و در ادامه، باهدف ارزیابی تأثیر هر مرحله بر فرآیند تصفیه و تغلیظ توکسوئید، هر بار با حذف یک مرحله از مراحل روتین، نتایج به‌دست‌آمده با یکدیگر مقایسه گردیدند.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت باکتری: سوش واکسینال PW-8 واریانت CN-2000 دیفتری، از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به‌صورت لیوفیلیزه تهیه و تحت شرایط آسپتیک به محیط کشت جامد لوله‌ای لوفلر منتقل و کشت داده شد. لوله‌ها در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه گردیدند تا زمانی که پرگنه‌ها روی آن مشاهده شدند. جهت اطمینان از عدم آلودگی کشت میکروبی، رنگ‌آمیزی گرم انجام گردید.

انتقال به محیط کشت استینر: بعد از اطمینان از عدم آلودگی کشت‌های میکروبی، پرگنه‌ها به محیط **کشت** استینر مایع منتقل شدند. ازآنجایی‌که با ادامه کشت باکتری *کورینه‌باکتریوم دیفتریه* در محیط کشت استینر، pH محیط به سمت اسیدی شدن می‌رود، هر ۴ ساعت یک بار توسط سود ۱ نرمال pH محیط تنظیم گردید. پس از ۴۸ ساعت از کشت حاصله رنگ‌آمیزی گرم تهیه گردید و در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰X مشاهده شد.

بهینه‌سازی فرآیند کشت جهت افزایش تولید توکسین: بهینه‌سازی فرآیند کشت با تغییر سه پارامتر غلظت آهن، دمای کشت و دور شیکر انجام شد. به‌منظور ارزیابی اثر غلظت آهن بر روی شرایط کشت باکتری، سه غلظت ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر آهن به محیط کشت اضافه شد. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد، میزان تولید توکسین در غلظت‌های مختلف از طریق سنجش Lf و Kf موردبررسی قرار گرفت. همچنین دماهای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای کشت باکتری مورد آزمایش قرار گرفتند. هر دما در سه تکرار بررسی گردید و میزان تولید توکسین در دماهای مختلف از طریق سنجش Lf و Kf با هم مقایسه شد.

سه مقدار ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ برای rpm تنظیم‌شده و میزان تولید توکسین در هرکدام ارزیابی شد. برای هر مقدار rpm سه تکرار انجام شد و مقادیر Lf و Kf در هر یک اندازه‌گیری گردید.

جداسازی توکسین ناخالص از پیکره باکتری‌ها: جهت جداسازی توکسین ناخالص از پیکره باکتری‌ها و مواد ته‌نشین شونده، از هرکدام از ظروف حاوی یک لیتر کشت *کورینه‌باکتریوم دیفتریه* میزان ۲۵ میلی‌لیتر به‌صورت آسپتیک برداشته و سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید. سوپرناتانت حاوی توکسین جداشده از پیکره‌ی باکتری برداشته شد تا در مراحل بعدی آزمایش مورداستفاده قرار گیرد.

آزمایش فلوکولاسیون رامون: برای انجام آزمایش رامون، استانداردهای توکسوئید و آنتی توکسوئید دیفتری به ترتیب به شماره‌های ۰۲/۱۷۶ و ۶۳/۰۰۷ از شرکت NIBSC خریداری گردید. توکسوئید استاندارد حاوی ۱۱۰۰ Lf/ampoule و آنتی توکسوئید حاوی 1300 IU/ampoule می‌باشد که با نرمال سالین و یا PBS استریل رقت سازی گردیدند. برای هر نمونه توکسین ناخالص، ۶ تیتر (با توجه به تجربیات قبلی) در نظر گرفته شد. بدین‌صورت که برای هر نمونه ۶ لوله آزمایش قرار داده و در لوله‌ها به ترتیب از شماره ۱ تا ۶ مقدار ۵۰۰ الی ۱۰۰۰ میکرولیتر آنتی‌توکسین استاندارد دیفتری رقیق‌شده، بر پایه Lf ۱۰۰ ریخته شد بطوریکه در لوله شماره ۱ تا ۶ به ترتیب مقدار ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر آنتی‌توکسین ریخته شد. سپس به هرکدام از لوله‌های حاوی آنتی‌توکسین، توکسین (و یا توکسوئید) ناخالص سانتریفیوژ شده به میزان ۱ ml اضافه شد سپس تا حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر در هر لوله، نرمال سالین و یا PBS اضافه گردید و پس از هم زدن آرام محتویات لوله‌ها، در داخل بن ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و هم‌زمان تایمر فعال گردید. لوله‌ها در فواصل زمانی هر یک دقیقه یک بار همزده شد و در مقابل باکس منبع نور با زمینه تاریک مشاهده‌گردید. پس از مشاهده واکنش توکسین با آنتی‌توکسین که درواقع اساس فلوکولاسیون رامون می‌باشد، اولین لوله که این واکنش در آن انجام شده بود به‌عنوان تیتر توکسین (Lf) و مدت‌زمان تا شروع واکنش به‌عنوان Kf ثبت گردید.

تعیین حداقل دوز کشنده (MLD): به‌منظور تعیین حداقل دوز کشنده توکسین [1](MLD)، از آزمون بر روی خوکچه‌هندی و به‌صورت in vivo استفاده شد. برای این منظور پس از ارزیابی و تأیید توکسین‌زایی، محیط رویی که حاوی توکسین بود با رقت‌های مختلف از $\frac{1}{500}$ تا $\frac{1}{10000}$ تهیه و سپس از هر رقت به‌صورت زیر جلدی به دو خوکچه‌هندی تزریق شد و خوکچه‌ها به مدت ۹۶ ساعت نگهداری شدند. سپس کمترین رقت توکسین که قادر بود طی ۹۶ ساعت خوکچه‌هندی را از بین ببرد به‌عنوان MLD توکسین تولیدشده در نظر گرفته گردید.

غیرفعال کردن توکسین باکتری (Toxin Inactivation): نمونه‌ای که در روش فلوکلوسیون رامون به دست آمده و حالت ابری در آن دیده **شده** بود، ابتدا سانتریفیوژ و کلاریفای شد و سپس توکسین استریل شده با ۴ در هزار فرمالین ۳۷٪ ترکیب و در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه مورد نظر به مدت ۶ هفته ازنظر بیوشیمیایی و سرولوژی، pH و Lf کنترل گردید.

تست سمیت اختصاصی (Specific Toxicity Test): لازم است که سمیت یا عدم سمیت توکسوئید تهیه شده، تعیین گردد. برای این **منظور**، جهت اطمینان از غیرفعال‌سازی و کنترل صحت تبدیل توکسین به توکسوئید، بعد از ۴۲ روز تست سمیت اختصاصی STT[2]به‌صورت تزریق زیر جلدی به گروه‌های ۵ تایی خوکچه‌هندی صورت گرفت. در این مدت افزایش وزن خوکچه‌ها و دیگر علائم کلینیکی به مدت ۴۲ روز کنترل گردید.

تغلیظ توکسوئید (Toxoid Concentration): جهت تغلیظ توکسوئید از اولترافیلتراسیون استفاده شد. برای این منظور مایع محتوی توکسوئید از یک طرف وارد دستگاه اولترافیلتر شده و از طرف دیگر مایع **تغلیظ** شده که حاوی مولکول توکسوئید و کلیه مولکول‌هایی که وزن مولکولی آن‌ها بیشتر از ۱۰ kDa بود، خارج شدند و در ظرف دیگری جمع‌آوری شدند. به دلیل کاهش حجم توکسوئید تغلیظ شده تا یک دهم حجم اولیه، غلظت توکسوئید تقریباً به ده برابر میزان اولیه رسید.

ترسیب توکسوئید (Toxoid Precipitation): به‌منظور انجام ترسیب، مقدار نمک آمونیوم سولفات در دو مرحله با درصدهای متفاوت (۱۰ و ۲۰ درصد) به محلول حاصله از مرحله اولترافیلتراسیون اضافه شد و به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس، در ابتدا آمونیوم **سولفات** ۱۰٪ با محلول به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس به مایع رویی آمونیوم سولفات ۲۰٪ اضافه گردید و پس از سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۴۰۰۰ rpm، این بار مایع رویی دور ریخته و مواد ته نشین شده نگهداری شد.

دیالیز توکسوئید: از دیالیز به‌منظور خارج نمودن نمک سولفات آمونیوم از رسوب حاوی پروتئین‌های اختصاصی استفاده شد. برای این منظور ۱۰ میلی‌لیتر **از** رسوبات جمع‌آوری شده در مرحله‌ی قبل حاوی برداشته شد و درون کیسه‌ی سلوفان مخصوص

[1] Minimum Lethal Dose

[2] Specialized Toxicity Test

دیالیز با کات آف ۱۰ کیلو دالتون ریخته و در داخل ظرف محتوی سرم فیزیولوژیک و یا آب مقطر استریل غوطه‌ور گردید. به‌منظور اطمینان از کامل شدن زمان دیالیز به‌صورت دوره‌ای از محلول داخل کیسه دیالیز نمونه‌برداری شد و ازنظر وجود یون سولفات مورد ارزیابی قرار گرفت که منفی شدن نتیجه نشان‌دهنده‌ی سپری شدن زمان لازم برای دیالیز تلقی گردید.

کروماتوگرافی توکسوئید: بعد از آماده‌سازی ستون کروماتوگرافی محتوی ژل سفادکس G-25، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از رسوب مرحله‌ی قبل بر روی ستون با قطر ۳ سانتی‌متر و ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر برده شد. ضمن آنکه از آب دو بار تقطیر با pH =7.2 به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد. پس از جمع‌آوری فراکسیون‌های خارج شده از ستون در زمان‌های مشخص توسط دستگاه فراکسیون کالکتور، میزان جذب هر فراکسیون با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد.

آزمایشات تقلیل مرحله‌ای: به‌منظور کاهش مراحل تصفیه و تخلیص توکسوئید، طراحی مراحل به‌صورتی انتخاب گردیدکه هر بار یکی از مراحل ترسیب، دیالیز و کروماتوگرافی حذف شد و نتایج حاصل با هم مقایسه گردیدند. برای این منظور بالک به دست آمده از اولترافیلتراسیون (مرحله‌ی تغلیظ) مورد استفاده قرار گرفت. برای هر گروه سه تکرار گذاشته شد و با انجام SDS-PAGE باند مربوط به توکسوئید تخلیص شده در هر یک از گروه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. باندهای حاصل از SDS-PAGE ارزیابی شده و اندازه‌ی آن‌ها با لدر مقایسه شد. از روی شدت باندها و نتایج پروتئین سنجی، میزان توکسوئید تخلیص شده در هر یک از شرایط تصفیه و تخلیص با هم مقایسه گردید.

یافته‌ها

بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید توکسین: به‌منظور بهینه‌سازی مقدار آهن محیط کشت برای دستیابی به بیشترین میزان تولید توکسین، سه غلظت ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر مورد بررسی قرار گرفتند. غلظت آهن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نتیجه متوسطی نشان داد و رشد مناسب باکتری با مقدار توکسین کم مشاهده شد. آهن موجود در محیط کشت با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بهترین نتیجه را ازنظر تولید توکسین (Lf) و کمترین زمان فلوکولاسیون (Kf) داشت. همچنین با غلظت آهن ۱/۵ نتیجه مناسبی حاصل نشد زیرا در این مقدار، باکتری توانایی رشد و تولید توکسین نداشت (شکل ۱-الف). در آزمایشی دیگر، دما برای بهینه‌سازی تولید توکسین مورد ارزیابی قرار گرفت. سه دمای ۳۵، ۳۶ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی شده و نتایج حاصل بیشترین میزان تولید توکسین را در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد (شکل ۱-ب). دور شیکر از موارد مؤثر در تولید توکسین دیفتری است. در تحقیق حاضر سه دور rpm ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ برای بهینه‌سازی تولید توکسین مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که دور rpm ۲۰۰ با بیشترین میزان تولید توکسین و کمترین Kf همراه بود (شکل ۱-ج).

جدول (۱): اندازه‌گیری **Lf** و **Kf** در نمونه‌های سه سری ساخت مقیاس آزمایشگاهی

Batch. Number	D00-1	D00-2	D00-3
L_f	۱۱۰	۹۰	۱۰۰
K_f	۴	۴	۳

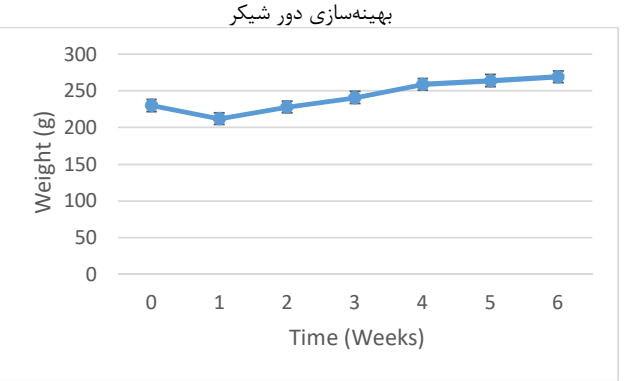
نتایج فلوکولاسیون رامون: در مرحله بهینه‌سازی تقلیل مرحله‌ای، بعد از غیر فعالسازی و فیلتر نمودن توکسوئید (۰،۲۲)، تست رامون انجام شد. این تست فلوکوله شدن آنتی‌بادی و آنتی‌ژن را نشان می‌دهد. مقدار توکسوئید موجود با مقدار آنتی‌توکسین (موجود در سرم‌سازی رازی In-house) ترکیب شده و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در بن ماری نگهداری شد. ارزیابی چشمی فلوکولاسیون در فواصل زمانی یک دقیقه انجام شد. D00 به معنی دیفتری تولیدی در سال ۱۴۰۰ و عدد بعد از خط فاصله، شماره آزمایش مربوطه می‌باشد که در سه تکرار انجام گردید.

نتایج تست کمترین دوز کشنده: در تحقیق حاضر پس از ارزیابی و تأیید توکسین‌زایی، محیط رویی که حاوی توکسین بود با رقت‌های مختلف، به‌صورت زیر جلدی به خوکچه‌های هندی که از قبل وزن کشی شده بودند تزریق گردید. این کار به مدت ۴ روز با بررسی مرگ‌ومیر خوکچه‌ها بررسی شد و رقت $\frac{1}{10000}$ کمترین رقتی بود که طی ۴ روز اول موجب مرگ خوکچه‌ها گردید و به‌عنوان حداقل دوز کشنده یا تیتر MLD ثبت شد.

نتایج تست سمیت اختصاصی: در آزمایشات تقلیل مرحله‌ای، پس از اتمام مرحله‌ی سمیت‌زدایی و تغلیظ با اولترافیلتراسیون (UF) یک نمونه به میزان Lf 2500 در هر میلی‌لیتر، برداشته شد. از نمونه‌ی جدا شده پس از رقت سازی، میزان Lf 500 به هر خوکچه تزریق شد. درگروه ۶ تایی به پنج سر از آن‌ها تزریق و یک سر از آن‌ها به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

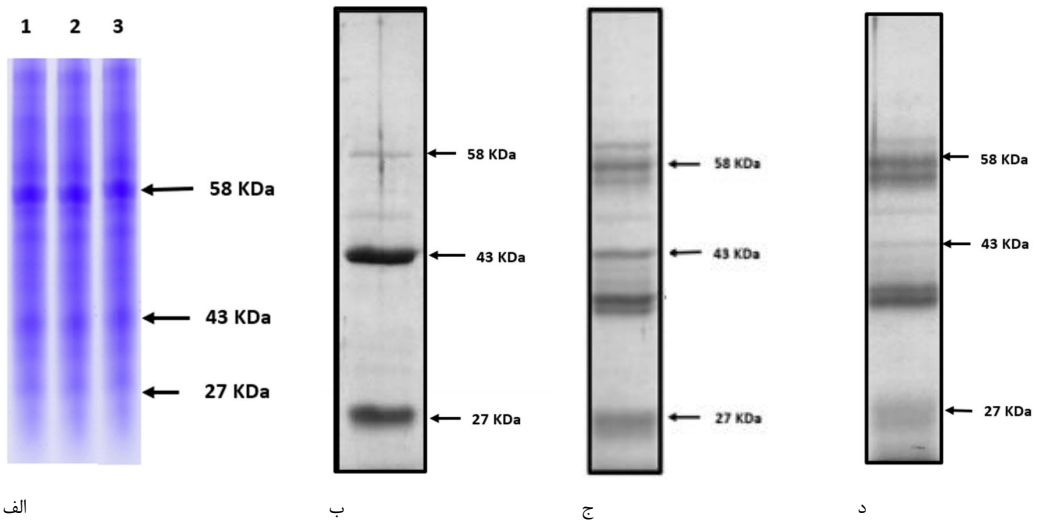
وزن‌گیری و بررسی علائم بالینی طی ۶ هفته انجام شد (شکل ۲). نتایج حاصل نشان داد که طی هفته اول کاهش ناچیزی در وزن خوکچه‌ها مشاهده شد (کمتر از ۱۰درصد) اما پس از آن روند افزایشی وزن‌گیری خوکچه ها تا هفته‌ی ششم مشاهده‌گردید.

شکل (۱): بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید توکسین. الف: بهینه‌سازی مقدار آهن محیط کشت، ب: بهینه‌سازی دمای انکوباسیون، ج: بهینه‌سازی دور شیکر



شکل (۲): نمودار نتایج میانگین وزن‌ها در تست سمیت اختصاصی

تقلیل مراحل تصفیه و تخلیص توکسوئید: تصفیه و تخلیص توکسوئید دیفتری با تغییراتی در روش معمول انجام شد و هر بار یکی از مراحل حذف شد تا نتیجه تقلیل مرحله‌ای در تخلیص توکسوئید ارزیابی گردد. در ابتدا از بچ غیر فعال (با فورمالدئید) و تغلیظ شده (به روش معمول اولترافیلتر) و با تائید تست سمیت اختصاصی استفاده گردید. پس از تائید تست سمیت اختصاصی (مبنی بر غیر فعال شدن کامل توکسین) فرایند ترسیب با آمونیوم سولفات در دو مرحله مطابق با روش‌های روتین با غلظتهای ۱۰ و ۲۰ در صد انجام گردید. در مرحله اول پس از مخلوط نمودن توکسوئید با آمونیوم سولفات و انکوبه نمودن و سپس سانتریفیوژ، مایع رویی (سوپرناتانت) برداشته شد و رسوب حاصله دور ریخته شد. در مرحله دوم، سوپرناتانت با غلظت دوم آمونیوم سولفات مخلوط و انکوبه شد و سپس سانتریفیوژ گردید. در این مرحله مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل جهت تقلیل مرحله‌ای استفاده شد. همچنانکه در روش کار بیان گردید، پس از این مرحله، رسوب حاصل با بافر مخلوط و در فرایندهای ۱- ستون به تنهایی ۲- دیالیز به تنهایی ادامه تخلیص انجام گردید. لازم به ذکر است که یک نمونه نیز بدون ادامه فرایند مستقیماً در ژل SDS-PAGE لود شد. نمونه آخر (بدون انجام دیالیز و ستون) جهت ارزیابی همزمان حذف دیالیز و ستون کروماتوگرافی انجام گردید. ژل‌های الکتروفورز اولیه ۸درصد بکار گرفته شدند. در مراحل بعدی با توجه به نیاز تفکیک باندهای پائینی، ژلهای تقلیل مرحله‌ای در ۱۲/۵درصد انجام شدند. با توجه به نتایج حاصل از SDS-PAGE (شکل ۳)، در سری نمونه‌های تخلیص شده با مراحل اولترافیلتراسیون، ترسیب و ستون کروماتوگرافی (گروه اول) بهترین نتیجه را ازنظر خلوص و نیز باقیمانده سولفات آمونیوم به دست آمد.



شکل (۳): باندهای حاصل از SDS-PAGE تقلیل مراحل تصفیه و تخلیص (الف: ژل الکتروفورز (۸درصد) سه سری ساخت توکسوئید خام دیفتری به شماره‌های ۱، ۲ و ۳، ب: ژل الکتروفورز (۱۲/۵درصد) توکسوئید دیفتری با روش اولترافیلتراسیون، ترسیب و ستون کروماتوگرافی، ج: ژل الکتروفورز (۱۲/۵درصد) توکسوئید دیفتری با روش اولترافیلتراسیون و ترسیب، د: ژل الکتروفورز (۱۲/۵درصد) توکسوئید دیفتری با روش اولترافیلتراسیون، ترسیب و دیالیز) (در همه شکل‌ها باند ۵۸ کیلو دالتون نشانگر توکسوئید خام می‌باشد. باندهای ۴۳ و ۲۷ کیلو دالتون نمایانگر فراگمنتهای B و A می‌باشند).

در سری نمونه‌های تخلیص شده با مراحل اولترافیلتراسیون و ترسیب نمونه مناسبی برای ادامه تولید واکسن ازنظر خلوص به دست نیامد. در نمونه‌های تخلیص شده با مراحل اولترافیلتراسیون، ترسیب و دیالیز نمونه گرفته شده به نسبت نمونه اول که دارای مرحله ستون کروماتوگرافی بود کیفیت مناسبی نداشت اما به نسبت مرحله دوم ازنظر خلوص نمونه بهتری به دست آمد ($p<0.05$). نتایج کمی اخذ شده از مراحل مختلف با نرم‌افزار Minitab 18 و تست Student's t و با p value کمتر از ۰،۰۵ مورد ارزیابی و سنجش آماری قرار گرفتند.

بحث و نتیجه‌گیری

تقریباً همه تولیدکنندگان واکسن دیفتری از گونه‌ای از سویه پارک ویلیامز ۸ (PW8) برای تولید اگزوتوکسین استفاده می‌کنند

که توکسوئید از آن با اصلاح شیمیایی تهیه می‌شود. به‌طور کلی، فرمولاسیون متوسط با اسیدهای آمینه، ویتامین‌های کمیاب، نمک‌های معدنی و منبع انرژی به شکل کربوهیدرات ویژگی‌های رشد عالی را برای باکتری فراهم می‌کند. محیط‌های مختلف مانند ژلاتین-هیدرولیزات، هضم اسیدی کازئین و هضم آنزیمی (تریپسین یا پاپائین) ماهیچه گاو، برای تولید توکسین مناسب هستند (۸).

تولید توکسین به میزان زیادی تحت تأثیر شرایط رشد به‌ویژه محتوای آهن غیر آلی در محیط کشت می‌باشد. به این ترتیب که فقط در مرحله رشد یا فاز مرگ که سوبسترای آهن محدودیت پیدا می‌کند، توکسین به بیشترین میزان تولید می‌شود. در محیط‌های کشت که محدودیت آهن دارند افزودن آهن بلافاصله تولید توکسین را مهار می‌کند (۹). در تحقیق حاضر بهترین غلظت آهن برای تولید توکسین، غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر بود. غلظت آهن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نیز نتیجه متوسطی نشان داد و رشد باکتری با مقدار توکسین کم مشاهده شد اما غلظت آهن ۱/۵ نتیجه منفی داشت زیرا در این مقدار باکتری توانایی رشد و تولید توکسین نداشت. دمای محیط کشت نیز در مقدار تولید توکسین مؤثر است و با بررسی سه دمای ۳۵، ۳۶ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تحقیق حاضر، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای بهینه تعیین شد. همچنین در میکروارگانیسم‌های هوازی مقدار اکسیژن در دسترس نقش مهمی در کینتیک میکروارگانیسم دارد. مقدار اکسیژن دهی می‌تواند تا حدودی با دور شیکر مشخص شود، اگرچه که شکل، حجم و نسبت حجم محیط کشت به حجم ظرف محتوی محیط کشت نیز از عوامل مؤثر در اکسیژن دهی می‌باشد. در تحقیق حاضر از میان سه مقدار ۱۰۰ rpm، ۱۵۰ و ۲۰۰، مقدار ۲۰۰ rpm بهترین نتیجه را برای تولید توکسین نشان داد.

روش‌های مختلفی برای بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید بیشتر توکسین مورد آزمایش قرار گرفته است. به‌عنوان مثال Sundaran و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که هنگامی که کشت ثابت با کشت غوطه ور در یک تخمیر جایگزین شود، افزایش قابل‌توجهی در عملکرد توکسین دیفتری در یک زمان کشت کوتاه مشاهده می‌گردد. همچنین مشخص شد که تحت شرایط بهینه دما، اختلاط محیط کشت و هوادهی سطحی، در یک pH قلیایی مناسب، باعث آزادسازی توکسین می‌شود. علاوه بر این، برای افزایش حجم تولید، کشت های نیمه پیوسته دو و سه مرحله‌ای انجام شد که توکسین تولید شده از تیتر خوب با خلوص آنتی ژنی کافی برخوردار بود (۱۰).

Fratelli و همکاران در سال ۲۰۱۱ روش‌های جایگزینی برای خالص‌سازی توکسین دیفتری را با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی و سم‌زدایی از طریق کونژوگاسیون با پلیمر متوکسی پلی‌اتیلن گلیکول فعال شده (mPEG) پیشنهاد کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که خالص‌سازی با به لو سفاروز یک روش کارآمد است که خلوص آنتی‌ژن معادل ۲۶۰۰ Lf/mg نیتروژن پروتئین را به دست می‌دهد. اصلاح توکسین خالص شده با mPEG منجر به ایجاد آدم یا نکروز در خوکچه‌هندی نشد، اگرچه ایمنی زا بود و تشکیل آنتی بادی‌هایی را تحریک کرد که می‌توانستند توکسین خالص شده را خنثی کنند (۱۱).

Chung و همکاران در سال ۲۰۱۶ به‌منظور به دست آوردن یک توکسوئید دیفتری بسیار خالص، شرایط بهینه برای بیان توکسین 300 Lf/ml در یک کشت فرمانتوری را تعیین کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که محدوده خاصی از K_La برای بیان سطح بالایی از توکسین دیفتری مورد نیاز بود. میزان بیان توکسین با توجه به شرایط کشت به‌طور قابل‌توجهی متفاوت بود. در این آزمایش تولید انبوه توکسوئید دیفتری با اصلاح هوادهی، با سطح خلوص بیش از ۲۵۰۰ Lf/mgPN از طریق خالص‌سازی و سم زدایی به دست آمد (۱۲).

Suwanpatcharakul و همکاران در سال ۲۰۱۶ چندین پارامتر مؤثر بر تولید توکسین *کورینه‌باکتریوم دیفتری* را مورد بررسی قرار دادند. مطالعات مقایسه‌ای پروفایل اسید آمینه در محیط بر پایه‌ی NZ آمین A (محیط NZ) و محیط مبتنی بر هضم گوشت گاو (محیط BD) نشان داد که عرضه ناکافی اسیدهای آمینه مسئول تولید کم توکسین مشاهده شده در محیط NZ نیست. مکمل اسیدهای آمینه اضافی و مواد مغذی محرک رشد (به شکل عصاره مخمر) در محیط NZ تنها رشد سلولی را افزایش داد اما تولید توکسین را تغییر نداد. بنابراین، محیط BD به‌عنوان مناسب‌ترین محیط پایه برای تولید توکسین با توجه به افزایش تولید توکسین انتخاب شد زیرا حد قابل‌توجهی فلوکولاسیون (۹۳ Lf/ml) را نسبت به محیط NZ (۴۶ Lf/ml) داشت (۱۳).

همچنین فرامرزی و همکاران در سال ۱۳۹۸ در یک مطالعه در راستای افزایش و ارتقاء کیفیت و کمیت مطلوب‌تر و موثرتر در تولید واکسن دیفتری، دو روش سپراتور و فیلترپرس را در جداسازی توکسین عامل مولد بیماری یعنی *کورینه باکتریوم دیفتریه* سویه واکسینال از پیکره باکتری‌های کشت یافته در فرمانتور، مورد بررسی و مقایسه قرار دادند. نتایج حاصله در تمامی آزمون‌ها در روش جداسازی با سپراتور نسبت به روش جداسازی با فیلترپرس دارای برتری قابل ملاحظه‌ای بود. همچنین حجم محصول نهایی پس از جداسازی و شفافیت آن به روش سپراتور بهتر از روش فیلترپرس بود. مضافاً اینکه زمان لازم برای جداسازی و هزینه‌های بکار رفته در روش سپراتور به مراتب کمتر از روش فیلترپرس بود (۱۴).

همان طور که مشخص است، بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید مقادیر بیشتر توکسین، برای اهداف صنعتی ارزشمند است و در تلاش‌هایی که در این زمینه صورت گرفته است، فاکتورهای مختلفی را مورد بررسی قرار داده‌اند. در تحقیق حاضر سه فاکتور مختلف برای بهینه‌سازی شرایط کشت مورد ارزیابی قرار گرفتند که شامل مقدار آهن موجود در محیط کشت، دمای کشت و دور شیکر بودند.

با مروری بر روش‌های مختلف تصفیه و خالص‌سازی توکسین دیفتری، مشخص می‌شود که تا کنون از تکنیک‌های مختلفی برای تخلیص این پروتئین استفاده شده است. برخی از این روش‌ها شامل افزودن پتاسیم به توکسین خام به‌منظور فراکسیونه نمودن توکسین خام، تغلیظ توکسین خام با استفاده از کلرید روی و سپس فراکسیونه کردن با سولفات آمونیوم و یا تغلیظ توکسین خام از طریق اولترافیلتراسیون و ترسیب پروتئین‌های اختصاصی با فسفات آمونیوم و کربنات سدیم می‌باشد (۱۵).

امروزه برخی از کارخانه‌های تولید واکسن به‌منظور تهیه‌ی واکسن دیفتری با خلوص بالا، پس از تغلیظ توکسین خام با اولترافیلتراسیون، از نمک سولفات آمونیوم برای رسوب دادن و فراکسیونه نمودن پروتئین‌های توکسین استفاده می‌کنند و سپس برای خالص‌سازی بیشتر توکسین یا توکسوئید، روی ستون‌های حاوی ژل‌های غربال مولکولی با تعویض یونی و یا به‌طور ساده بر روی کروماتوگرافی با فیلتراسیون ژلی برده می‌شود. اگرچه با انجام کروماتوگرافی بر روی فنیل سفاروز و DEAE-Cellulose توانسته‌اند توکسینی با خلوص ۹۹درصد تهیه کنند و با استفاده از محلول اشباع ۶۰-۴۰ درصد سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی رسوبات بر روی DEAE-Cellulose و یا سفادکس G-100 توکسینی با خلوص بالا تهیه شده است، اما همواره باید به یک نکته توجه داشت که برای تولید یک محصول در مقادیر زیاد، علاوه بر خلوص مشخص و بازدهی محصول تهیه شده، مسائل اقتصادی نیز حائز اهمیت است. تولید واکسن‌های توکسوئیدی با خلوص مطلق نه‌تنها امکان‌پذیر نمی‌باشد، حتی ضروری هم به نظر نمی‌رسد (۱۱). بنابراین با توجه به تجربیات فوق‌الذکر برای تهیه‌ی توکسوئید با خلوص بالا، توکسوئید دیفتری با به‌کارگیری امکانات تولید تصفیه گردید که این فرآیندها شامل اولترافیلتراسیون توکسین خام جهت تغلیظ آن، استفاده از Salting out جهت ترسیب پروتئین‌ها، دیالیز جهت حذف نمک‌های مرحله‌ی قبل و کروماتوگرافی بر روی ژل‌های سفادکس برای نمک‌زدایی بیشتر و فراکسیونه کردن بودند.

در این تحقیق ابتدا مراحل روتین تصفیه و تخلیص که شامل هر چهار مرحله‌ی اولترافیلتراسیون، ترسیب، دیالیز و کروماتوگرافی بود انجام شد. پس از انجام اولترافیلتراسیون که ذرات بر اساس اندازه جداسازی می‌شوند، سپس ترسیب انجام شد. در این مرحله از دو غلظت ۱۰درصد و ۲۰درصد نمک آمونیوم سولفات استفاده شد. درواقع غلظت ۱۰درصد نمک آمونیوم سولفات موجب حذف مولکول‌های بزرگتر و غلظت ۲۰درصد موجب حذف مولکول‌های کوچکتر می‌شود. بعد از ترسیب، دیالیز و سپس کروماتوگرافی انجام گردید. سپس برای تقلیل مراحل، تغییراتی در مراحل چهارگانه روتین انجام پذیرفت. بدین‌صورت که سری اول مرحله‌ی دیالیز حذف شده و تخلیص توکسوئید با مراحل اولترافیلتراسیون، ترسیب و کروماتوگرافی انجام شد. باندهای حاصل از این روش مشابه باندهای روش روتین بوده و نشان می‌داد که حذف مرحله‌ی دیالیز تأثیر آنچنانی بر روی توکسوئید تخلیص شده ندارد و باقیمانده آمونیوم سولفات نیز از حد مجاز کمتر بود. در سری دوم مراحل دیالیز و کروماتوگرافی حذف شدند و تخلیص تنها با اولترافیلتراسیون و ترسیب انجام شد. نتایج حاصل از این روش مناسب نبودند زیرا همانطور که انتظار می‌رفت در اولترافیلتراسیون و ترسیب تنها مولکول‌های اضافه حذف می‌شدند اما تخلیص نهایی (پولیشینگ) انجام نمی‌شد و در نتیجه باندهای خوبی در SDS-PAGE مشاهده نشد. مضافاً اینکه، نیاز به برداشت باقیمانده آمونیوم سولفات در محلول می‌باشد. در حالت بعد اولترافیلتراسیون، ترسیب و دیالیز انجام شد که در این روش نیز باندهای مناسبی به دست نیامد اما نسبت به حالتی که تنها اولترافیلتراسیون و ترسیب انجام شده بود، بهتر بود. بنابراین به نظر می‌رسد که از مراحل چهارگانه، تنها دیالیز با توجه به استفاده از کروماتوگرافی، قابلیت حذف شدن دارد و سایر مراحل برای دستیابی به توکسوئید با خلوص مناسب، ضروری هستند. اگرچه که استفاده از (Tangential Flow Filtration) TFF در مرحله اولیه جداسازی و نیز مرحله نهایی تخلیص توانسته است جایگزین مناسبی برای هر دو دیالیز و ستون کروماتوگرافی باشد.

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر از دو طریق بهینه‌سازی تولید توکسوئید دیفتری انجام شد که شامل بهینه‌سازی بعضی از پارامترهای فرآیند کشت و بهینه‌سازی فرآیند تصفیه و تخلیص بود. در روند کشت باکتری برای تولید توکسین بیشتر، نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که مقدار آهن ۱ میلی‌گرم بر لیتر، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۲۰۰ rpm در شرایط آزمایشگاهی، بهترین شرایط را برای تولید توکسین فراهم می‌کنند. همچنین به‌منظور کاهش مراحل تصفیه و تخلیص توکسوئید، روندهای مختلفی مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج حاصل نشان داد که در سری نمونه‌های تخلیص شده با مراحل اولترافیلتراسیون، ترسیب و ستون کروماتوگرافی بهترین نتیجه به دست آمد. در سری نمونه‌های تخلیص شده با مراحل

اولترافیلتراسیون و ترسیب نمونه مناسبی برای تولید واکسن به دست نیامد و ناخالصی‌های باقیمانده نیاز به فرایندهای تکمیلی دارد. در نمونه‌های تخلیص شده با مراحل اولترافیلتراسیون، ترسیب و دیالیز نمونه گرفته شده به نسبت نمونه اول که دارای مرحله ستون کروماتوگرافی بود کیفیت پائین تری داشت اما به نسبت مرحله دوم نمونه بهتری به دست آمد. بنابراین با توجه به یافته‌های آزمایش حاضر، مرحله‌ی دیالیز می‌تواند در سری مراحل تضفیه و تخلیص قابل حذف باشد و حذف این مرحله با توجه به داده‌های SDS-PAGE و ارزیابی باقیمانده آمونیوم سولفات خلوص مناسب‌تری را به همراه خواهد داشت. ازآنجاکه در تولید صنعتی، زمان و هزینه دو فاکتور کلیدی هستند، لذا با حذف مرحله‌ی دیالیز که به‌طور تقریبی دو هفته به طول می‌انجامد، می‌توان تولید توکسوئید برای واکسن دیفتری را با هزینه کمتر و در زمان کوتاه‌تر انجام داد. مع‌هذا ارزیابی باقیمانده‌های مراحل نهایی تخلیص نیاز به ارزیابی بیشتر خواص فیزیکوشیمیایی، ازت پروتئین (خلوص) و یونهای باقیمانده دارد که می‌تواند اساس مطالعات آینده در این حوزه باشد. در طی مطالعه حاضر علیرغم همکاری همه‌جانبه بخش تولید در انجام آن، هماهنگی با فرآیندهای روتین کاری و عدم تداخل با آن‌ها از مشکلات دست و پا گیر اجرا بودند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از کارکنان بخش میکروب‌شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کمال قدردانی را دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارضی در منافع وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

تحقیق اخیر بر اساس پروژه مصوب و حمایت مالی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و با شناسه اخلاق IR.RVSRI.REC.1401.006 انجام گرفت.

حامی مالی

تحقیق اخیر بر اساس پروژه مصوب و حمایت مالی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی با کد 990723-111-18-18-2 انجام گرفت.

References:

1- Donyapoor F, Zeinoddini M, Saeedinia AR. Cloning and expression of recombinant immunotoxin using diphtheria toxin and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). J Arak Un Med Sci 2016;19(5):42–50.

2- Eaton MD. The purification and concentration of diphtheria toxin: I. evaluation of previous methods; Description of a new procedure: I. Evaluation of previous methods; Description of a new procedure. J Bacteriol 1936;31(4):347–66. Available from: http://dx.doi.org/10.1128/jb.31.4.347-366.1936

3- WHO-recommended standards for surveillance of selected vaccine-preventable diseases. World Health Organization Geneva. 1999. https://doi.org/10.1128/jb.31.4.347-366.1936

4- Hennart M, Panunzi LG, Rodrigues C, Gaday Q, Baines SL, Barros-Pinkelnig M, et al. Population genomics and antimicrobial resistance in Corynebacterium diphtheriae. Genome Med 2020;12(1):107. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s13073-020-00805-7

5- . Offit PA, Quarles J, Gerber MA, Hackett CJ, Marcuse EK, Kollman TR, et al. Addressing parents' concerns: do multiple vaccines overwhelm or weaken the infant's immune system? Pediatrics 2002;109(1):124–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1542/peds.109.1.124

6- Organization WH. Diphtheria vaccine: WHO position paper. Vaccine. 2017;36(2):199–201.

7- Rappuoli R, Malito E. History of diphtheria vaccine development. Corynebacterium diphtheriae and related toxigenic species. Springer; 2014. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7624-1_11

8- Iwaki M, Komiya T, Yamamoto A, Ishiwa A, Nagata N, Arakawa Y. Genome organization and pathogenicity of Corynebacterium diphtheriae C7 (−) and PW8 strains. Infection Immunity 2010;78(9):3791–800. https://doi.org/10.1128/IAI.00049-10

9- Spiering MM, Ringe D, Murphy JR, Marletta MA. Metal stoichiometry and functional studies of the diphtheria toxin repressor. Proc Natl Acad Sci U S

A 2003;100(7):3808–13. Available from: http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0737977100

10- Sundaran B, Udaya Bhaskara Rao Y, Boopathy R. Process optimization for enhanced production of diphtheria toxin by submerged cultivation. J Biosci Bioeng 2001;91(2):123–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/s1389-1723(01)80053-0

11- Fratelli F, Abrahão-Neto J, Caricati ATP, Borges MM, Guidolin R, Caricati CP. An alternative method for purifying and detoxifying diphtheria toxin. Toxicon 2011;57(7–8):1093–100. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.04.015

12- Chung Y-J, Lee J-A, Jung M-Y, Lee S-M, Kim T-Y, Choe Y-K, et al. Optimization of diphtheria toxin production by Corynebacterium diphtheriae using a casein-based medium in a fermenter. Biotechnol Bioprocess Eng 2016;21(4):537–43. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s12257-016-0360-9

13- Suwanpatcharakul M, Pakdeecharoen C, Visuttitewin S, Pesirikan N, Chauvatcharin S, Pongtharangkul T. Process optimization for an industrial-scale production of Diphtheria toxin by Corynebacterium diphtheriae PW8. Biologicals 2016;44(6):534–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.08.002

14- Faramarzi A, Noofeli M, Tofighi A, Shahcheraghi F. Comparison of the diphtheria toxin separation methods on standard vaccine strain using separator and filter presses to improve the quality & quantity of the final product. 2019.

15- Carroll SF, Barbieri JT, Collier RJ. Diphtheria toxin: purification and properties. Methods Enzymol 1988;165:68 76. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(88)65014-2.

Original Article

OPTIMIZATION OF CULTURE PROCESS AND PURIFICATION OF DIPHTHERIA TOXOID BY STEP REDUCTION

*Samaneh Mohammad Javad[1], Mojtaba Noofeli[*2], Ali Nazari Shirvan[3], Pejvak Khaki[4]*

Received: 02 September, 2023; Accepted: 19 December 2023

Abstract

***Background & Aim*:** Diphtheria is an acute vaccine-controlled respiratory disease caused by the gram-positive bacterium *Corynebacterium diphtheria*. Since the preparation, purification, and detoxification of the vaccine against this disease involves many and complex steps, the present study aimed reduction of time of various stages of toxoid purification.

***Materials & Methods*:** For this purpose, three factors were first optimized for the concentration of iron in the culture medium, incubation temperature and rotation speed to produce more toxins. In each case, the experiment was carried out in triplicate and Lf and Kf values were tested to evaluate toxin production. After toxin inactivation and production of the toxoid, step reductions were performed to purify the toxoid. For this, ultrafiltration, precipitation, dialysis and chromatography with Sephadex G-25 column are used. In step reduction conditions, dialysis, chromatography or both of them were removed in the first, second and third cases, respectively. The results of each method were evaluated by SDS-PAGE and the quantitative data was analyzed using Minitab 18 ($p<0.05$).

***Results*:** The results for optimizing the culture medium showed that highest amounts of toxin were produced at an iron concentration of 1 mg/l, a temperature of 35 °C, and a rotation speed of 200 rpm($p<0.05$). In the reduction experiments related to toxoid purification steps, the best results were obtained in a series of purified samples with ultrafiltration, precipitation and column chromatography steps.

***Conclusion*:** Since time and cost are two key factors in industrial production, toxoid production for the diphtheria vaccine can be produced at a lower cost and in less time by eliminating the two-week dialysis phase.

***Keywords*:** Diphtheria, Purification, Step Reduction, Toxoid

***Address*:** Antigen group, R&D Dept., Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
Tel: +989198386718
***Email*:** noofeli1234@yahoo.com

SOURCE: STUD MED SCI 2023: 34(9): 575 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

[1] *Microbiology Dept., Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.*
[2] *Antigen group, R&D Dept., Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Purification group, R&D Dept., Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.*
[4] *Microbiology Dept., Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.*